Aus dem Institut für Hygiene der Universität Düsseldorf

und dem Medizinischen Institut für Lufthygiene und
Silikoseforschung an der Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. med. Hans-Werner Schlipköter

Abteilung für Experimentelle Pathologie
Leiter: Professor Dr. med. Werner Hilscher

Histometrische Untersuchungen an bestrahlten Rattenhoden

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin.
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Bernd Dulisch

1977

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544323_0080

Aus dem Institut für Hygiene der Universität Düsseldorf

und dem Medizinischen Institut für Lufthygiene und
Silikoseforschung an der Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. med. Hans-Werner Schlipköter

Abteilung für Experimentelle Pathologie
Leiter: Professor Dr. med. Werner Hilscher

Histometrische Untersuchungen an bestrahlten Rattenhoden

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin.
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Bernd Dulisch

1977

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.:
Prof. Dr. med. Schadewaldt

Referent
gez.:
Prof. Dr. med. Hilscher

Korreferent
gez.:
Prof. Dr. med. Hofmann

I n h a l t s v e r z e i c h n i s

Seite

Einleitung 1

Material und Methodik

a) Versuchstiere 2

b) Bestrahlung 3

c) Methode der morphologischen Auswertungen . 4

Resultate 6

Diskussion 11

Zusammenfassung 18

Literatur 20

Anhang

a) Tabelle 1 - 3

b) Figur 1 - 6

E i n l e i t u n g

Über Untersuchungen bestrahlter Hoden ist in zahlreichen Veröffentlichungen berichtet worden (Schinz und Slotopolski 1924, 1925; Oberndorfer 1931; Hertwig 1939; Schaefer 1939; Joel und v. Wattenwyl 1941; v. Wattenwyl und Joel 1941 a, b; Shaver 1953; Oakberg 1955 a, b, 1957, 1959; Monesi 1962; Hilscher 1964, 1967; Dym und Clermont 1970; Oakberg und Huckins 1976). Im Vordergrund des Interesses standen hierbei einmal diejenige Röntgendosis, die zu einer bleibenden Eliminierung des Samenepithels führt, und zum anderen der Regenerationsmodus des Samenepithels. Die Frage nach dem Regenerationsmodus unter normalen und pathologischen Bedingungen, u. a. nach Bestrahlung, ist dabei bis heute ungeklärt geblieben (Clermont und Hermo 1976, Oakberg und Huckins 1976).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die nach der Röntgenbestrahlung auftretenden Schäden quantitativ zu erfassen. Als geeignete Methode bot sich die "Treffermethode" nach Haug (1955) an, mit deren Hilfe Flächenbestimmungen durchgeführt werden können.

Um mögliche Veränderungen der Hormonwerte mit den morphologischen Veränderungen zu vergleichen, wurde an denselben Tieren von Dr. Hopkinson eine Bestimmung der Androgen- und Östrogenwerte im Serum sowie der Gonadotropine LH und FSH durchgeführt.

Material und Methodik

Versuchstiere

Die Versuche wurden mit 44 Wistarratten (Wistar-WU-Neuherberg) eines Inzuchtstammes durchgeführt, der durch die planmäßige Bruder-Schwester-Paarung am Institut für Biologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung in Neuherberg bei München herangezüchtet worden war. Alle Tiere entstammten der 23. Generation der planmäßigen Bruder-Schwester-Paarung. Das Erbgut der Versuchstiere aus der 23. Inzuchtgeneration kann als homozygot angesehen, somit können genetisch bedingte Unterschiede ausgeschlossen werden. Zudem handelt es sich bei sämtlichen Tieren um Brüder oder Halbbrüder im Alter von 7 Monaten, die zuvor mehrmals erfolgreich verpaart worden waren und dabei ihre Fertilität bewiesen hatten.

Die Anzahl der Tiere in den 7 Versuchsgruppen und die Zeiten zwischen Bestrahlung und Tötung sind in Tabelle 1 (siehe Anhang) aufgeführt. Außerdem wurden die Hoden von 13 unbestrahlten Tieren (aufgeteilt in 2 Kontrollgruppen) histometrisch untersucht. Diese Auswertungen erfolgten zu Beginn bzw. am Ende der Versuchsreihe.

Die Tiere wurden in Gruppen zu 5 - 6 in Makrolon-Käfigen gehalten, deren Bodenfläche mit einer Einlage von autoklavierten Hobelspänen bedeckt war. Die Ratten lebten in vollklimatisierten Räumen bei einer Temperatur von 22 - 25° C und künstlicher Beleuchtung, die 12 Stunden täglich (von 7 - 19 Uhr) eingeschaltet war. Futter und Wasser standen ad libidum zur Verfügung.

Die Bestrahlung und Tötung der Tiere erfolgte jeweils zwischen 13 und 17 Uhr.

Bestrahlung

Die Hoden der 44 Ratten in den 7 Versuchsgruppen wurden einer einmaligen lokalen Bestrahlung von 300 R harter Röntgenstrahlen ausgesetzt.

Die Strahlenqualität war wie folgt definiert:

Stromstärke	10 mA
Anodenspannung	50 kV
Fokus-Objekt-Abstand	60 cm
Filterung	0,6 mm Cu-Blech
	1,0 mm Al-Blech

Zur Bestrahlung wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Injektion von Evipan^{R} narkotisiert. Nach Eintritt der Narkose wurde die Ratte auf ein Holzbrett gespannt und durch eine Bleiplatte abgedeckt. In dieser Bleiplatte war ein Loch, welches über das Skrotum gebracht wurde.

Die Strahlendosis wurde mit einer Fingerhutkammer gemessen. Zunächst wurde für jede Versuchsgruppe die Bestrahlungsdauer zur Erreichung der gewünschten Strahlendosis bei Berücksichtigung der Raumtemperatur und des Luftdruckes im Blindversuch ermittelt. Dazu legte man einer Ratte, die im weiteren Versuch nicht berücksichtigt wurde, die Fingerhutkammer zwischen die beiden Hoden, und es wurde die Zeit gemessen, die notwendig war, um 300 R Strahlendosis zu erreichen. Als Zeitraum wurde der Mittelwert von drei Blindmessungen gewählt. Während der Bestrahlung der Versuchstiere

lag die Fingerhutkammer auf Höhe der Leber neben der Ratte unter dem Bleischutz, um die Streustrahlung zu messen. Die Streustrahlung betrug im Mittel 7 R.
Durch die harte Strahlenqualität war gewährleistet, daß der Abfall der Strahlenintensität innerhalb des Hodens so gering war, daß er vernachlässigt werden konnte. Eine stichprobeweise Überprüfung hatte ergeben, daß der Strahlenabfall in der gesamten Ratte einschließlich der Knochenschatten bei der gewählten Strahlenqualität unter 3 Prozent lag.

Methode der morphologischen Auswertungen

In der vorliegenden Arbeit wurde davon ausgegangen, daß der durch die Röntgenstrahlen verursachte Zelluntergang mit einer entsprechenden Volumenabnahme einhergeht, die sich bei mikroskopischer Betrachtung als Flächenabnahme zeigt. Zur Ausmessung der Flächenveränderungen wurde die "Treffermethode" nach Haug (1955) angewandt. Bei der "Treffermethode" handelt es sich um ein für die Zytomorphologie modifiziertes Punktzählverfahren, bei dem eine näherungsweise Integration der Fläche mit Hilfe eines Quadratnetzes vorgenommen wird (Weber 1973). Dazu wurde im vorliegenden Fall in das Okular ein Netzquadrat eingelegt, welches die Fläche des Blickfeldes in ein Großquadrat mit 400 Kleinquadraten gliederte.

Es wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Teilflächen des Samenkanälchenquerschnittes bestimmt:

1. die "Interstitiumfläche" (Spalte 1), d. i. die Fläche der Kerne und des Cytoplasmas der interstitiellen Zellen,

wobei bei sämtlichen Wertungen ein Tubulusquerschnitt in das Centrum des Großquadrates geschoben wurde, und die interstitiellen Zellen im übrigen, d. h. peripheren, Teil des Großquadrates ausgemessen wurden,

2. die "gesamte Tubulusfläche" (Spalte 2), d. i. die Summe der unter Punkt 3 bis 7 beschriebenen Flächen,
3. die "Basalzellkernfläche" (Spalte 3), d. i. die Fläche der Kerne der Spermatogonien, präleptotänen, leptotänen und zygotänen Spermatocyten,
4. die "Spermatocytenkernfläche" (Spalte 4), d. i. die Fläche der Kerne von pachytänen und diplotänen Spermatocyten,
5. die "Spermatidenkernfläche" (Spalte 5), d. i. die Fläche der Kerne von runden und elongierten Spermatiden,
6. die "Lumenfläche" (Spalte 6), d. i. die Fläche, die die Lichtung des Tubulusquerschnittes einnimmt,
7. die "Cytoplasmafläche" (Spalte 7), d. i. die Fläche des Tubulusquerschnittes, die nach Abzug der unter Punkt 3, 4, 5 und 6 definierten Flächen von der "gesamten Tubulusfläche" resultiert.

Die Auswertungen wurden bei 200facher Gesamtvergrößerung (Objektiv 20fach, Okular 10fach) durchgeführt. Bei dieser Vergrößerung war die Voraussetzung erfüllt, daß der eingestellte Kanälchenquerschnitt allseits vom Großquadrat überragt wurde. Auch war eine eindeutige Identifizierung der Geschlechtszellen erst ab dieser Vergrößerung möglich. Insgesamt wurden von jedem Tier 100 Kanälchenquerschnitte ausgewertet.

R e s u l t a t e

Um die Voraussetzungen für einen Vergleich zwischen den Kontroll- und Versuchsgruppen zu schaffen, wurden zunächst die Ergebnisse der beiden Kontrollgruppen statistisch untersucht. In den Kontrollgruppen waren Tiere aus zwei verschiedenen Würfen zusammengefaßt.

Die statistischen Untersuchungen ergaben, daß sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Parameter der beiden Kontrollgruppen nachweisen ließen. Deshalb wurden bei den weiteren Berechnungen die Kontrollgruppen nicht mehr getrennt behandelt, sondern zusammengefaßt. Damit konnte eine gewisse Homogenität des gesamten Tiermaterials vor Beginn des Versuches vorausgesetzt werden.

Bei der Prüfung auf Normalverteilung der Werte ergab sich, daß die Meßwerte fast immer keine signifikante Abweichung von der Normalverteilung zeigten. Um bei den Gruppen der bestrahlten Tiere mögliche "Ausreißer" zu ermitteln, wurden folgende statistische Untersuchungen vorgenommen: Es wurden die Mittelwerte von 4 Flächengrößen ("Interstitiumfläche", "gesamte Tubulusfläche", "Spermatocytenkernfläche","Spermatidenkernfläche") den Berechnungen zugrunde gelegt. Diejenigen Tiere, die bei zwei oder mehr Meßgrößen eine signifikante Abweichung (Scheffé-Test, Sachs 1969) von den Mittelwerten der anderen Tiere der Gruppe zeigten, wurden bei den weiteren Mittelwertberechnungen nicht mehr berücksichtigt. Insgesamt wurden 5 Tiere als "Ausreißer" ermittelt (8. Tag - ein Tier; 26. Tag - zwei Tiere; 39. Tag - ein Tier; 52. Tag - ein Tier). Nach Abzug dieser "Ausreißer"

wurden die Mittelwerte und deren Vertrauensbereich für die Anzahl der Treffer über den einzelnen Flächen ermittelt (Tabelle 2). Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Flächenwerten wurde durch den Scheffé-Test ermittelt. Das Signifikanzniveau der von den Kontrollgruppen abweichenden Werte ist in Tabelle 2 mit + ($\hat{=}$ $p<0,05$), ++ ($\hat{=}$ $p<0,01$) und +++ ($\hat{=}$ $p<0,001$) gekennzeichnet.

Bei den Untersuchungen an den unbestrahlten Hoden wurden folgende Flächenwerte ermittelt. Der Mittelwert für die "gesamte Tubulusfläche" beträgt 4,878 mm^2. Davon fallen 0,17 mm^2, das sind 3,5 % auf die "Basalzellkernfläche", 0,552 mm^2 (11,31 %) auf die "Spermatocytenkernfläche" und 0,831 mm^2 (17,04 %) auf die "Spermatidenkernfläche". Die "Cytoplasmafläche" innerhalb des Kanälchens beträgt 2,653 mm^2 (54,38 %) und die "Lumenfläche" hat eine Größe von 0,666 mm^2 (13,65 %).

Aus den Werten in Tabelle 2 kann entnommen werden, daß die "Interstitiumfläche" (Figur 1) in der beobachteten Zeit nach der Bestrahlung ansteigt. Ab dem 18. Tag (nach der Bestrahlung) ist eine signifikante Erhöhung ($p<0,05$) dieser Fläche gegenüber den Kontrollgruppen festzustellen. Am 45. Tag hat sich die Fläche der interstitiellen Zellen auf das Doppelte der Ursprungsfläche vergrößert. Zwischen dem 45. und 52. Tag ist ein signifikanter Abfall ($p<0,001$) der "Interstitiumfläche" festzustellen.

Die "gesamte Tubulusfläche" (Figur 2) zeigt bis zum 13. Tag eine leichte, nicht signifikante Vergrößerung. Nach dem 13. Tag nimmt der Tubulusquerschnitt ab. Am 26., 39., 45. und 52. Tag hat sich die "gesamte Tubulusfläche" signifikant

($p < 0{,}001$) gegenüber der Fläche bei den Kontrollgruppen verkleinert.

Die "Basalzellkernfläche" (Figur 3) zeigt schom am 8. Tag eine signifikante Abnahme im Vergleich mit den Kontrollgruppen. Am 13. Tag hat die "Basalzellkernfläche" einen sehr niedrigen Wert erreicht und bleibt auf diesem Niveau bis zum 39. Tag. Die Fläche umfaßt nun ungefähr ein Fünftel derjenigen Fläche, die bei den Kontrollgruppen vorhanden ist. Am 52. Tag hat die "Basalzellkernfläche" wieder leicht zugenommen. Die Zunahme vom 13. zum 52. Tag ist signifikant ($p < 0{,}05$).

Die "Spermatocytenkernfläche" (Figur 4) ist am 8. Tag leicht, aber nicht signifikant gegenüber den Kontrollgruppen erhöht. Nach dem 8. Tag nimmt sie ab. Die Meßergebnisse vom 18., 26., 39., 45. und 52. Tag zeigen, daß die "Spermatocytenkernfläche" an diesen Tagen signifikant kleiner ist als bei den Kontrollgruppen. Die größten Veränderungen finden zwischen dem 13. und 26. Tag statt.

Weiterhin ist in Tabelle 2 zu ersehen, daß sich die "Spermatidenkernfläche" (Figur 5) bis zum 13. Tag vergrößert, doch ist diese Zunahme nicht signifikant. Nach dem 13. Tag verringert sich die "Spermatidenkernfläche". Die stärkste Abnahme ist zwischen dem 26. und 39. Tag zu verzeichnen. Die Meßwerte vom 39., 45. und 52. Tag sind signifikant von denen der Kontrollgruppen verschieden.

Die "Cytoplasmafläche" (Figur 6) zeigt bis zum 18. Tag eine Zunahme (nicht signifikant). Nach dem 18. Tag nimmt die "Cytoplasmafläche" ab. Am 39. Tag ($p < 0{,}01$) sowie am 45.

und 52. Tag ($p < 0{,}001$) sind die Werte für die "Cytoplasmafläche" signifikant kleiner als die der Kontrollgruppen. Die "Lumenfläche" (Figur 6) ist am 8. und 13. Tag leicht, aber nicht signifikant gegenüber den Kontrollgruppen erhöht. Nach dem 13. Tag nimmt die "Lumenfläche" ab. Am 18. und 26. Tag liegen die Meßwerte signifikant niedriger als in den Kontrollgruppen. Am 39., 45. und 52. Tag ist eine Zunahme der "Lumenfläche" festzustellen. Die "Lumenfläche" ist an diesen Tagen gegenüber den niedrigen Werten vom 18. und 26. Tag signifikant größer.

Die von Dr. Hopkinson an denselben Tieren zum Zeitpunkt der Tötung durchgeführten Bestimmungen der Geschlechtshormone Testosteron und Östradiol 17 β sowie der Gonadotropine FSH und LH brachten folgendes Ergebnis: "Nach der Bestrahlung zeigen die Werte für FSH und LH einen Anstieg. Dieser Effekt ist signifikant am 39. und 45. Tag nach der Bestrahlung für LH und 39., 45. und 52. Tag für FSH. Am 52. Tag verbleibt der FSH-Spiegel signifikant über dem Ausgangswert, während der LH-Spiegel nicht mehr signifikant gegenüber den Kontrollgruppen erhöht ist. Dies mag in der großen Streubreite der Ergebnisse vom 52. Tag begründet liegen. Der Testosteronwert zeigt nach 39 Tagen einen Abfall, doch ist diese Veränderung nicht signifikant. Der Östradiol-Spiegel zeigt keinen klaren Trend und auch keine signifikanten Veränderungen."

In Tabelle 3 ist das Ergebnis der Korrelation zwischen den Meßgrößen für LH, FSH, Testosteron (Testo), Östrogen (Östro), "Interstitiumfläche" (Inter), "gesamte Tubulusfläche"

(Tubfl), "Basalzellkernfläche" (Basal), "Spermatocytenkernfläche" (Spcy), "Spermatidenkernfläche" (Spti) und "Cytoplasmafläche" (Cyto) zusammengestellt. Es wurden bei dieser Aufstellung alle 57 Versuchstiere berücksichtigt. Der Korrelationskoeffizient ist ein Maß für die lineare Assoziation zwischen je zwei Meßgrößen. Dabei bedeutet + 1 maximale positive und - 1 maximale negative Korrelation. In der unteren Hälfte der Aufstellung sind nur diejenigen Werte aufgeführt, die eine signifikante positive ($> 0{,}26$) oder negative ($< -0{,}26$) Korrelation wiedergeben.

Aus der Aufstellung ist u. a. zu ersehen, daß

1. zwischen den Meßwerten für die "gesamte Tubulusfläche" einerseits und den Meßwerten für die "Spermatiden-" und "Spermatocytenkernfläche" andererseits eine deutliche positive Korrelation besteht,
2. zwischen den Meßwerten für die "Cytoplasmafläche" einerseits und den Meßwerten für die "Spermatiden-" und "Spermatocytenkernfläche" andererseits eine deutliche positive Korrelation besteht,
3. zwischen den Meßwerten für die "Interstitiumfläche" und den Meßwerten für die Fläche über den Kernen der drei Geschlechtszellgruppen eine teilweise sehr deutliche negative Korrelation besteht,
4. zwischen den Meßwerten für LH und FSH eine starke positive Korrelation festzustellen ist,
5. zwischen den Meßwerten für LH und FSH einerseits und den Meßwerten für die "Spermatiden-" und "Spermatocytenkernfläche" andererseits eine deutliche negative Korrelation

besteht,

6. zwischen den Meßwerten für LH und FSH einerseits und den Meßwerten für die "Interstitiumfläche" andererseits eine deutliche positive Korrelation besteht,
7. zwischen den Meßwerten für Testosteron und den Meßwerten für die Kernfläche der einzelnen Geschlechtszellgruppen eine positive Korrelation besteht, die bei allen drei Gruppen in der gleichen Größenordnung liegt.

Die hier unter Punkt 5, 6 und 7 aufgeführten Korrelationen zwischen Hormon- und Flächenwerten beziehen sich nur auf die Betrachtung aller 37 Versuchstiere. Innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen waren diese Korrelationen nicht festzustellen. Dies mag zum einen in der geringen Anzahl der Tiere in den Versuchsgruppen, zum anderen aber auch darin begründet liegen, daß die Korrelationen zwischen den Hormon- und Flächenwerten nur bei Berücksichtigung der verschiedenen Zeiträume zwischen Tötung und Untersuchung nachweisbar werden.

D i s k u s s i o n

Durch die Bestrahlung werden vor allem diejenigen Geschlechtszellen geschädigt, die sich in der Proliferation befinden und dabei eine DNA-Synthese durchlaufen. Es sind dies die nahe der Zellmembran gelegenen Spermatogonien und präleptotänen Spermatocyten. Durch die Schädigung dieser Zellen unterbleibt der Nachschub von Abkömmlingen - successor cells - d. h. von leptotänen, zygotänen, pachytänen und diplotänen I-Spermatocyten, II-Spermatocyten sowie runden und

elongierten Spermatiden. Da die Cyclusdauer, das ist die Zeit, die eine Geschlechtszelle benötigt, um von einer Keimzellschicht in die nächst höhere zu gelangen, 13 Tage beträgt (Hilscher 1964), kann aus dem Vorhandensein von Lücken im Keimzellverband nach 13, 26, 39 und 52 Tagen geschlossen werden, welche Zellkategorie durch die Bestrahlung geschädigt wurde. Als Beispiel seien die Lücken nach 13 Tagen im Bereich der B-Spermatogonien in den Stadien IV - VI sowie der präleptotänen I-Spermatocyten in Stadium VII bis zu den pachytänen Spermatocyten in den Stadien VI angeführt. Das Fehlen dieser Zellen ist auf eine Schädigung ihrer Vorläufer - precursor cells - zurückzuführen, nämlich der differenzierenden Spermatogonien A_1 bis B sowie der präleptotänen I-Spermatocyten. Das Fehlen der Spermatogonien A_1, A_2, A_3, A_4 und Im nach 13 Tagen ist ebenfalls auf Schädigung der betreffenden precursor cells zurückzuführen, wobei dahingestellt bleiben muß, welche Zellen als precursor cells in Frage kommen (Hilscher, Hilscher und Maurer 1969; Hilscher 1974; Clermont und Hermo 1976; Oakberg und Huckins 1976). Der nach 13 Tagen gefundene niedrige Wert für die "Basalzellkernfläche", in welcher sämtliche Kernflächen der differenzierenden Spermatogonien A_1 bis B sowie der präleptotänen, leptotänen und zygotänen I-Spermatocyten enthalten sind, ist somit ohne weiteres erklärbar. Das gleiche gilt auch für die auf die "Basalzellen" folgenden pachytänen und diplotänen Spermatocyten, deren Kernfläche die "Spermatocytenkernfläche" bildet, sowie für die runden und elongierten Spermatiden, deren Kernfläche die "Spermatiden-

kernfläche" bildet. Der starke Abfall der "Spermatocytenkernfläche" zwischen dem 13. und 26. Tag sowie der starke Abfall der "Spermatidenkernfläche" zwischen dem 26. und 39. Tag ist gleichfalls als Ausdruck des fehlenden Nachschubs zu werten. Über den Regenerationsmodus des Samenepithels besteht, wie oben ausgeführt, noch keine einhellige Meinung. Einig ist man sich nur darüber, daß die Regeneration nach der Bestrahlung von strahlenresistenten Spermatogonien ausgeht (Hilscher 1974; Clermont und Hermo 1976; Oakberg und Huckins 1976). 39 Tage nach der Bestrahlung ist in unserem Versuch wieder ein leichter Anstieg der "Basalzellkernfläche" festzustellen. Dies deutet auf eine beginnende Regeneration des Samenepithels hin. Am 52. Tag ist die "Basalzellkernfläche" wieder auf die Hälfte der ursprünglichen Fläche bei den Kontrollgruppen angewachsen. Doch ob damit eine Restitutio ad integrum eingeleitet wird, kann nach dieser relativ kurzen Versuchsdauer noch nicht entschieden werden.
Die Abnahme der "gesamten Tubulusfläche" ist auf den Schwund der "Cytoplasmafläche" sowie der "Spermatocyten-" und "Spermatidenkernfläche" zurückzuführen. Dies kommt auch in der sehr deutlichen positiven Korrelation zwischen der "gesamten Tubulusfläche" einerseits und der vom Cytoplasma sowie der von den Spermatocyten- und Spermatidenkernen eingenommenen Fläche andererseits zum Ausdruck.
Die "Lumenfläche" nimmt nach einem leichten Anstieg am 13. Tag bis zum 26. Tag nach der Bestrahlung stark ab. Am 26. Tag sind in den Samenkanälchen neben den Sertolizellen so gut wie nur noch Spermatiden nachweisbar. Diese nehmen einen

Teil der "Lumenfläche" ein. Der Abfall der "Spermatidenkernfläche" nach dem 39. Tag geht mit einem Anstieg der "Lumenfläche" einher. Am 52. Tag nimmt die "Lumenfläche" ein Drittel der "gesamten Tubulusfläche" ein.
Die Zunahme der "Interstitiumfläche" bis zum 45. Tag darf nicht ohne weiteres mit einer einfachen oder numerischen Hypertrophie der interstitiellen Zellen gleichgesetzt werden. Der Anstieg der "Interstitumfläche" könnte z. B. auch dadurch bedingt sein, daß die interstitiellen Zellgruppen aufgrund der Schrumpfung der Samenkanälchen dichter zusammenrücken. Dies würde dann im mikroskopischen Bild bei der quantitativen Auswertung durch die "Treffermethode" zu einer Vergrößerung der "Interstitiumfläche" führen, ohne daß das Gesamtvolumen der interstitiellen Zellen im Hoden zugenommen hätte. Andererseits könnte aber auch eine einfache oder numerische Hypertrophie der Leydigzellen der Grund für die Zunahme der "Interstitiumfläche" sein. Die Hypertrophie der interstitiellen Zellen wäre dann durch den erhöhten Gonadotropinspiegel bedingt, denn die Hormonproduktion der Leydigzellen wird normalerweise durch FSH gesteuert. Eine Erhöhung der Testosteronwerte ist aber nicht aufgetreten, was möglicherweise auf eine Schädigung der Leydigzellen durch die Bestrahlung zurückzuführen wäre.
Zusammenfassend kann gesagt werden, daß aufgrund der hier vorliegenden histometrischen und biochemischen Daten nicht sicher zu entscheiden ist, ob die Zunahme der "Interstitiumfläche" nach der Bestrahlung auf einer echten Hypertrophie der Leydigzellen oder nur auf einer scheinbaren Volumenzunahme

beruht.

Die Auswertungen ergaben, daß im Rattenhoden 5 Wochen nach der Bestrahlung so gut wie keine Spermatiden mehr nachweisbar waren. Bei einer Gesamtdauer von 42,4 Tagen für die Spermatocytogenese (20,4 Tage) plus Spermiogenese (22,4 Tage) (Hilscher und Hilscher 1969) sowie einer geschätzten Verweildauer der Spermatozoen im Nebenhoden von 10 Tagen (Orgebin-Christ 1965) dürften 7 Wochen nach der Bestrahlung keine Spermatozoen im Ejakulat vorhanden sein. Diesbezügliche Untersuchungen des Rattenejakulats wurden aber in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt. In diesem Zusammenhang sind jedoch Untersuchungen von Speiser, Rubin, Casarett (1973) von Interesse, die das Ejakulat von Patienten untersuchten, bei denen wegen einer Lymphogranulomatose eine Bestrahlung der Inguinalgegend, und damit auch der Hoden, vorgenommen worden war. Die Autoren fanden 8 Wochen nach der Bestrahlung keine Spermatozoen mehr im Ejakulat. Unter der Voraussetzung, daß die Dauer der Spermatocytogenese plus Spermiogenese der Ratte mit der Dauer der entsprechenden Spermatogenesestufen des Menschen korreliert, kann aus den bekannten Daten für die Cyclusdauer der Ratte (13 Tage - Hilscher 1964) und des Menschen (16 Tage - Heller und Clermont 1965) sowie für die Dauer der Spermatocytogenese plus Spermiogenese der Ratte die Dauer der Spermatocytogenese plus Spermiogenese des Menschen berechnet werden. Es ergibt sich ein Wert von 51,2 Tagen, zu dem noch die Verweildauer der Spermatozoen im Nebenhoden von etwa 10 Tagen gerechnet werden muß. Der so

gewonnene Wert von ca. 60 Tagen, nach denen im Ejakulat keine Spermatozoen mehr nachgewiesen werden sollten, stimmt mit dem tatsächlich von Speiser, Rubin und Casarett gefundenen Wert von 8 Wochen gut überein.

Bei der Interpretation der biochemischen Veränderungen unter Hinzuziehung der histometrischen Ergebnisse kommt Dr. Hopkinson zu dem Schluß, daß mit diesen Untersuchungen ein weiterer indirekter Nachweis des Hormons "Inhibin" gelungen sei. Bisher ist nur über indirekte Nachweise dieses Hormons berichtet worden, denn die Isolierung und biochemische Identifizierung dieses Hormons ist bisher noch nicht gelungen. Dem Hormon "Inhibin" wird eine Funktion bei der Steuerung der FSH-Ausschüttung zugeschrieben. Dies soll der Rückkopplungsfaktor in dem Regelkreis Hypophyse - Hoden - Hypophyse sein. Hohe Inhibinproduktion soll zu einer verminderten FSH-Ausschüttung führen, während niedrige Inhibinwerte hohe FSH-Werte zur Folge haben. Dr. Hopkinson kommt zu dem Ergebnis, daß aufgrund der starken positiven Korrelation zwischen den FSH- und LH-Werten in diesem Versuch auch eine Steuerung der LH-Ausschüttung durch Inhibin nachgewiesen wurde. Die Ansicht, daß auch der LH-Spiegel von "Inhibin" gesteuert wird, wurde auch schon von einigen anderen Autoren in neueren Veröffentlichungen vermutet (Bain und Keene 1975; Main et alii 1976). Ebenfalls ist eine starke positive Korrelation zwischen den LH- und FSH-Werten einerseits und den "Spermatocyten-" und "Spermatidenkernflächen" andererseits festzustellen. Dies läßt darauf schließen, daß der Inhibinabfall und der damit induzierte

LH- und FSH-Anstieg auf den Schwund der späten Stadien der Spermatogenese, bes. der Spermatiden, zurückzuführen ist. In den bisherigen Veröffentlichungen wurde berichtet, daß sehr wahrscheinlich die Sertolizellen in Verbindung mit den Spermatiden für die Inhibinproduktion verantwortlich sind. Diese Behauptung kann durch die in diesem Versuch durchgeführten biochemischen und histometrischen Untersuchungen und deren Ergebnisse gestützt werden.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die Testes von 44 Wistarratten waren einer lokalen Bestrahlung mit harter Röntgenstrahlung ausgesetzt (Dosis 300 R) und dann zusammen mit den Testes von 15 Kontrolltieren histometrisch untersucht worden. Angewandt wurde die sogenannte "Treffermethode" nach Haug (1965). Die Auswertungen von 100 Kanälchenquerschnitten pro Tier ergaben, daß der Anteil der Fläche der Geschlechtszellkerne an der Kanälchenfläche nach der Röntgenbestrahlung abnahm. Die Fläche der Kerne der "Basalzellen" - bestehend aus den Spermatogonien sowie präleptotänen, leptotänen und zygotänen I-Spermatocyten - nahm nach der Bestrahlung stark ab und war am 15. Tag nach der Bestrahlung auf $^1/_5$ der entsprechenden Fläche bei den Kontrollgruppen abgesunken. Die "Spermatocytenkernfläche" nahm erst ab dem 18. Tag, die "Spermatidenkernfläche" sogar erst ab dem 26. Tag nach der Bestrahlung nennenswert ab. Der Schwund der Spermatocyten und Spermatiden beruht auf dem fehlenden Nachschub seitens der Vorläuferzellen, hauptsächlich der differenzierenden Spermatogonien und präleptotänen Spermatocyten, die durch die Bestrahlung irreversibel geschädigt worden waren. Eine "Repopulation" des Samenepithels war am 40. Tag nach der Bestrahlung aufgrund des Anstiegs der "Basalzellkernfläche" festzustellen, doch war diese bis zum 52. Versuchstag noch nicht abgeschlossen.

Die Verringerung des Querschnittes der Samenkanälchen, die in der Abnahme der "gesamten Tubulusfläche" zum Ausdruck kam, ging auch mit einer Abnahme der "Cytoplasmafläche"

einher. Die "Lumenfläche" war am 26. Tag stark reduziert. An diesem Tag fanden sich in den Kanälchen neben Sertolizellen fast nur noch Spermatiden, die einen Teil der "Lumenfläche" eingenommen hatten. Nach der Transformation dieser Spermatiden zu Spermatozoen wurde die "Lumenfläche" wieder größer. Die "Interstitiumfläche" nahm nach der Bestrahlung zu. Es konnte nicht geklärt werden, ob diese Zunahme absolut oder relativ war.

Im Zusammenhang mit den biochemischen Untersuchungen von Dr. Hopkinson, der die Hormone Testosteron, Östradiol 17 β, LH und FSH im Blutserum untersuchte, liefern die vorliegenden histometrischen Untersuchungen ein weiteres Indiz für die Existenz des Hormons "Inhibin". Dieses Hormon soll für die Steuerung der Gonadotropinausschüttung verantwortlich sein, und es soll im Hoden von den Sertolizellen nur in Verbindung mit den Spermatiden produziert werden können. In unseren Untersuchungen war nach dem Schwund der Spermatiden aus den Kanälchen ein Anstieg der LH- und FSH-Werte festzustellen, was vermuten läßt, daß die Spermatiden eine Funktion bei der Inhibinproduktion erfüllen.

L i t e r a t u r

BAIN, J., KEENE, J.: Further evidence for inhibin: Change in serum luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone levels after X-irradiation of rat testis. J. Endocr. 66, 279 - 280 (1975).

CLERMONT, Y., HERMO, L.: Spermatogonial stem cells and their behaviour in the seminiferous epithelium of rats and monkeys. In: Stem Cells of Renewing Cell Population. ed. by A. B. Cairnie, P. K. Lala New York, San Francisco, London: Academic press 273 - 286 (1976).

DYM, M., CLERMONT, Y.: Role of spermatogonia in the repair of the seminiferous epithelium following X-radiation of the rat testis. Am. J. Anat. 128, 265 - 282 (1970).

HAUG, H.: Treffermethode, ein Verfahren zur quantitativen Analyse im histologischen Schnitt. Z. Anat. Entwicklungsgeschichte 118, 302 - 312 (1955).

HAUG, H.: Bedeutung und Grenzen der quantitativen Meßmethoden in der Histologie. Medizinische Grundlagenforschung 4, 299 - 344 (1962).

HELLER, W., CLERMONT, Y.: Spermatogenesis in man: an estimate of its duration. Science 140, 184 - 186 (1963).

HENNIG, A.: Das Problem der Kernmessung. Mikroskopie 12, 174 - 202 (1957).

HENNIG, A.: Kritische Betrachtung zur Volumen- und Oberflächenmessung in der Mikroskopie. Zeiss-Werkzeitschrift 30, 78 - 86 (1958).

HILSCHER, P., HILSCHER, W., MAYER, W.: Autoradiographische Untersuchungen über den Modus der Proliferation und Regeneration des Samenepithels der Wistarratte. Z. Zellforschung 94, 593 - 604 (1969).

HILSCHER, W.: Beiträge zur Ortho1ogie und Pathologie der "Spermatogoniogenese" bei der Ratte. Beitr. Pathol. Anat. 130, 69 - 132 (1964).

HILSCHER, W.: DNA synthesis; Proliferation and regeneration of spermatogonia in the rat. Colloque Internat. sur la physiologie de la reproduction chez les mammifères, Paris 1966, in Arch. micr. Morph. exp. 56, 75 - 84 (1967).

HILSCHER, W.: Kinetik der Präspermatogenese und Spermatogenese. Verh.-Anat. Ges. 68, 39 - 62 (1974).

HOPKINSON, C. et alii: Hormon and histological parameters following testicular irradiation in rats. bisher unveröffentlicht.

JOEL, C. A., v. WATTENWYL, H.: Zur Frage der Degeneration des Samenepithels nach Röntgenbestrahlung. Zschr. mikrosk.-anat. Forsch. 50, 121ff (1941).

MAIN, J. et alii: Serum and pituitary gonadotrophins after destruction of germinal cells in the testis by X-irradiation. J. Endocr. 69, 23P (1976).

MONESI, V.: Relation between X-rays sensitivity and stages of the cell cycle in spermatogonia of the mouse. Rad. Res. 17, 809 - 838 (1962).

OAKBERG, E. F.: Sensitivity and time of degeneration of spermatogenic cells irradiated in various stages of maturation in the mouse. Rad Res. 2, 369 - 391 (1955).

OAKBERG, E. F.: Gamma-ray sensitivity of spermatogonia of the mouse. J. Exp. Zool. 134, 343 - 356 (1957).

OAKBERG, E. F.: Initial depletion and subsequent recovery of spermatogonia of the mouse after 20 r of gamma-rays and 100, 300 and 600 r of X-rays. Rad. Res. 11, 700 - 719 (1959).

OAKBERG, E.F., HUCKINS, C.: Spermatogonial stem cell renewal in the mouse as revealed by ^{3}H-Thymidin labeling and irradiation. In: Stem Cells of Renewing Cell Population. ed. by A. B. Cairnie, P. K. Lala. New York, San Francisco, London: Academic press, 287 - 302 (1976).

OBERNDORFER, S.: Die inneren männlichen Geschlechtsorgane. Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie von Henke-Lubarsch, VI, 427, Julius Springer, Berlin (1931).

ORGEBIN-CHRIST, M. C.: Passage of spermatozoa labeled with thymidine-^{3}H through the ductus epididymis of the rabit. J. Reprod. Fertility 10, 241 - 251 (1965).

SACHS, L.: Beurteilung linearer Kontraste nach Scheffé. In: Statistische Auswertungsmethoden. 2. neubearb. und erweiterte Aufl. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 492 - 495 (1969).

SCHINZ, H.R., SLOTOPOLSKI, B.: Der Röntgenhoden. Erg. med. Strahlenforschung 1, 444 - 526 (1925).

SHAVER, S. L.: X-irradiation injury and repair in the germinal epithelium of the male rats. In: Injury and repair in adult rats. Amer. J. Anat. 92, 391 - 432 (1953).

SPEISER, B. et alii: Apsermia following lower truncal irradiation in Hodgkin's disease. Cancer (Phil.) 32, 692 - 698 (1973).

v. WATTENWYL, H., JOEL, C. A.: Die Wirkung der Röntgenstrahlen auf den Rattenhoden. II. Mitteilung: Technik der experimentellen Röntgenbestrahlung des Rattenhodens und Methodik zur Prüfung der Strahlenwirkung. Allgemeine Darstellung der Veränderungen am Samenepithel nach Röntgenbestrahlung. Strahlentherapie 70, 499 - 521 (1941).

v. WATTENWYL, H., JOEL, C. A.: Die Wirkung der Röntgenstrahlen auf den Rattenhoden. III. Mitteilung: Verlauf der Degeneration bzw. Regeneration des Samenepithels nach Bestrahlung mit 60 - 2400 r bis zu 50 Tage nach der Bestrahlung. Strahlentherapie. 70, 588 - 631 (1941).

WEBER, A.: Ein quantitativer Lymphknotentest. Silikosebericht Nordrhein-Westfalen Bd. 9, 145 - 157 (1973).

Tabelle 1

Tötung der Tiere	Umfang der Versuchsgruppe
ohne Bestrahlung (1. Kontrollgruppe)	6 Tiere
ohne Bestrahlung (2. Kontrollgruppe)	7 Tiere
8 Tage nach der Bestrahlung	7 Tiere
13 Tage nach der Bestrahlung	6 Tiere
18 Tage nach der Bestrahlung	6 Tiere
26 Tage nach der Bestrahlung	6 Tiere
39 Tage nach der Bestrahlung	6 Tiere
45 Tage nach der Bestrahlung	6 Tiere
52 Tage nach der Bestrahlung	7 Tiere

In Tabelle 1 sind die verschiedenen Zeiträume zwischen Bestrahlung und Tötung der Tiere sowie die Aufteilung der 44 Tiere zu den 7 Versuchsgruppen zusammengestellt.

Tabelle 2

	Interstitium	ges.Tub.-fl.	Basalzellen	Spermatocyten	Spermatiden	Lumen	Cytoplasma
Kontrolle	1491 ± 60,5	5873 ± 236,5	205 ± 15,5	665 ± 32	1006 ± 53	802 ± 48,5	3194 ± 178,5
8 Tage	1563 ± 52,5	5805 ± 289	94^{+++} ± 14	697 ± 66	1054 ± 84	882 ± 63,5	3078 ± 282
13 Tage	1678 ± 46	6089 ± 217	42^{+++} ± 18	618 ± 43,5	1135 ± 78,5	996 ± 114,5	3298 ± 99,5
18 Tage	1784^{+} ± 224,5	5477 ± 153,5	41^{+++} ± 36	389^{+++} ± 49	1065 ± 171	521^{+} ± 89,5	3461 ± 194
26 Tage	2747^{+++} ± 108	4067^{+++} ± 143	50^{+++} ± 14,5	76^{+++} ± 29	892 ± 48,5	319^{+++} ± 35	2730 ± 92
39 Tage	2982^{+++} ± 230,5	3446^{+++} ± 98	61^{+++} ± 29,5	85^{+++} ± 21	58^{+++} ± 31	630 ± 144	2611^{++} ± 198,5
45 Tage	3115^{+++} ± 153	2893^{+++} ± 129	88^{+++} ± 24,5	51^{+++} ± 10,5	8^{+++} ± 6,5	763 ± 141	1984^{+++} ± 51,5
52 Tage	2636^{+++} ± 222,5	2793^{+++} ± 254	106^{+++} ± 47	43^{+++} ± 35	4^{+++} ± 7,5	1073 ± 451,5	1566^{+++} ± 186,5

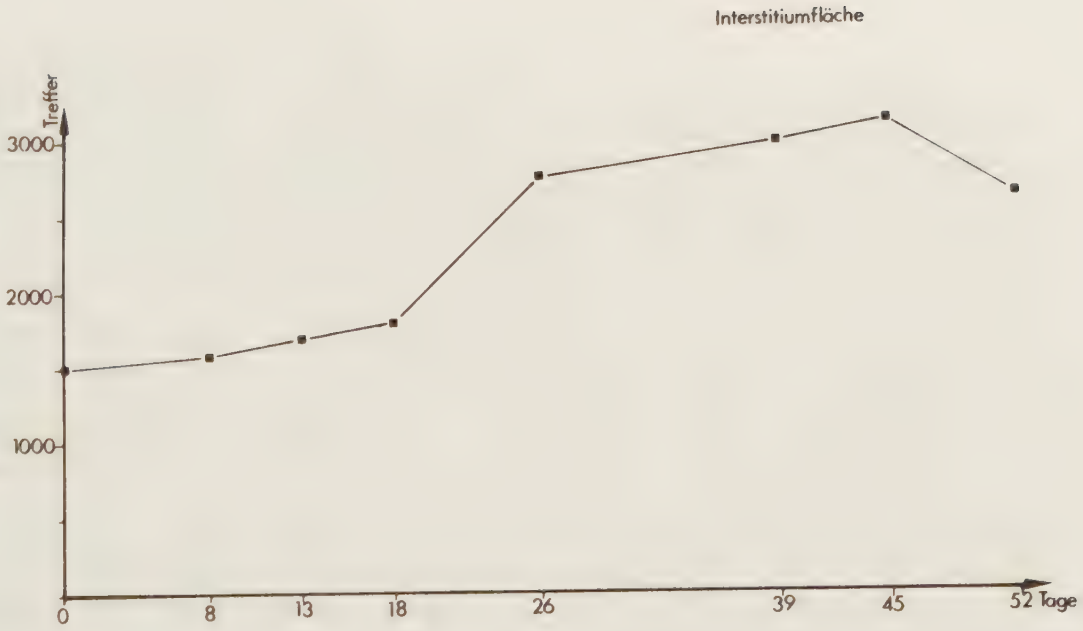
Die Tabelle 2 enthält die Treffer (Mittelwerte und Vertrauensbereich der Mittelwerte) über der "Interstitiumfläche", der "gesamten Tubulusfläche", den "Basalzell-", "Spermatocyten-" und "Spermatidenkernen", dem "Lumen" sowie dem "Cytoplasma" bei den Kontrollgruppen und den Versuchstieren vom 8. bis zum 52. Tag nach der Bestrahlung. Die Angaben beziehen sich jeweils auf 100 ausgewertete Kanälchen bzw. bei der "Interstitiumfläche" auf 100 Großquadrate. Das Signifikanzniveau der von den Kontrollgruppen abweichenden Werte ist mit + ($\hat{=}\ p < 0{,}05$), ++ ($\hat{=}\ p < 0{,}01$) und +++ ($\hat{=}\ p < 0{,}001$) gekennzeichnet.
Ein Treffer entspricht einer Fläche von 830,7 μm^2.

Tabelle 3

	LH	FSH	Testo	Östro	Inter	Tubfl	Basal	Spcy	Spti	Cyto
LH	1,00	0,81	0,29	0,05	0,66	-0,67	-0,06	-0,59	-0,75	-0,42
FSH	0,81	1,00	-0,31	-0,08	0,74	-0,82	-0,22	-0,74	-0,85	-0,63
Testo	-0,29	-0,31	1,00	0,11	-0,43	0,45	0,38	0,43	0,43	0,32
Östro	----	----	----	1,00	-0,13	0,24	-0,12	0,18	0,14	0,26
Inter	0,66	0,74	-0,43	----	1,00	-0,82	-0,38	-0,89	-0,76	-0,53
Tubfl	-0,67	-0,82	0,45	----	-0,82	1,00	0,24	0,92	0,93	0,75
Basal	----	----	0,38	----	-0,38	----	1,00	0,40	0,09	0,14
Spcy	-0,59	-0,74	0,43	----	-0,89	0,92	0,40	1,00	0,79	0,59
Spti	-0,75	-0,85	0,43	----	-0,76	0,93	----	0,79	1,00	0,71
Cyto	-0,42	-0,63	0.32	----	-0,53	0,75	----	0,59	0,71	1,00

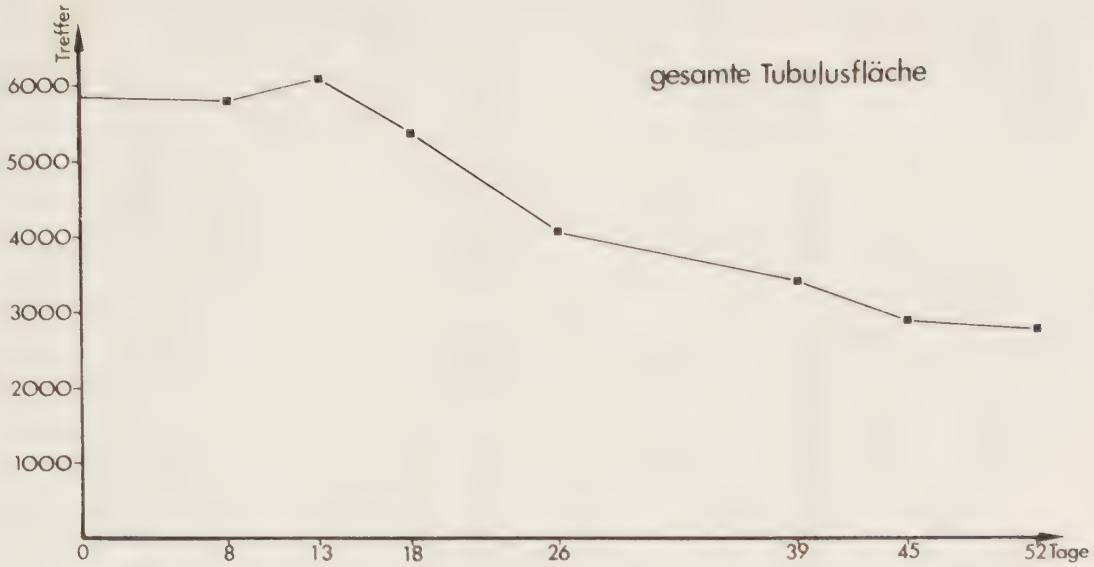
In Tabelle 3 sind die Korrelationskoeffizienten zwischen den Meßgrößen für LH, FSH, Testosteron (Testo), Östrogen (Östro), "Interstitiumfläche" (Inter), "gesamte Tubulusfläche" (Tubfl), "Basalzellkernfläche"(Basal), "Spermatocytenkernfläche" (Spcy), "Spermatidenkernfläche" (Spti) und "Cytoplasmafläche" (Cyto) zusammengestellt. In der unteren Hälfte der Aufstellung sind nur diejenigen Werte aufgeführt, die eine signifikante positive ($> 0,26$) oder negative ($< -0,26$) Korrelation wiedergeben.

Figur 1



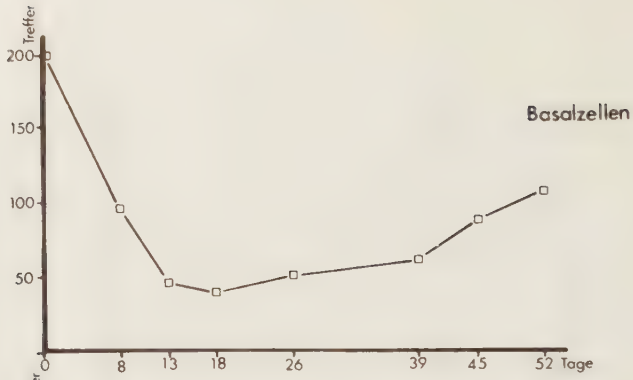
In F i g u r 1 sind die Mittelwerte der Treffer über der "Interstitiumfläche" für die Kontrollgruppen (0 Tage) und die Versuchsgruppen (8 - 52 Tage nach der Bestrahlung) graphisch dargestellt. Die Werte beziehen sich jeweils auf 100 Großquadrate.

Figur 2

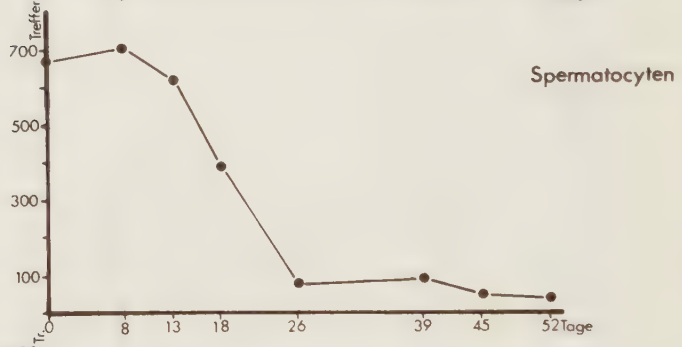


In Figur 2 sind die Mittelwerte der Treffer über der "gesamten Tubulusfläche" bezogen auf 100 Kanälchenquerschnitte für die Kontrollgruppen (0 Tage) und Versuchsgruppen (8 – 52 Tage nach der Bestrahlung) graphisch dargestellt.

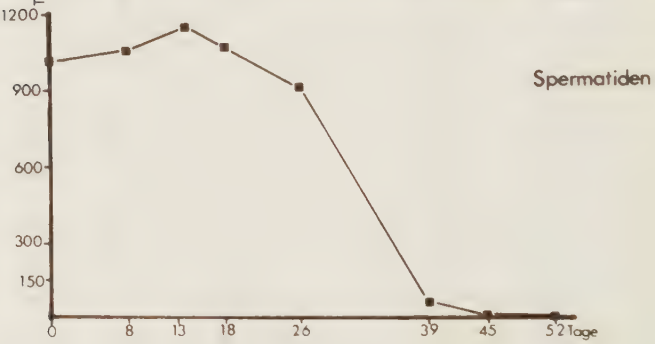
Figur 3



Figur 4

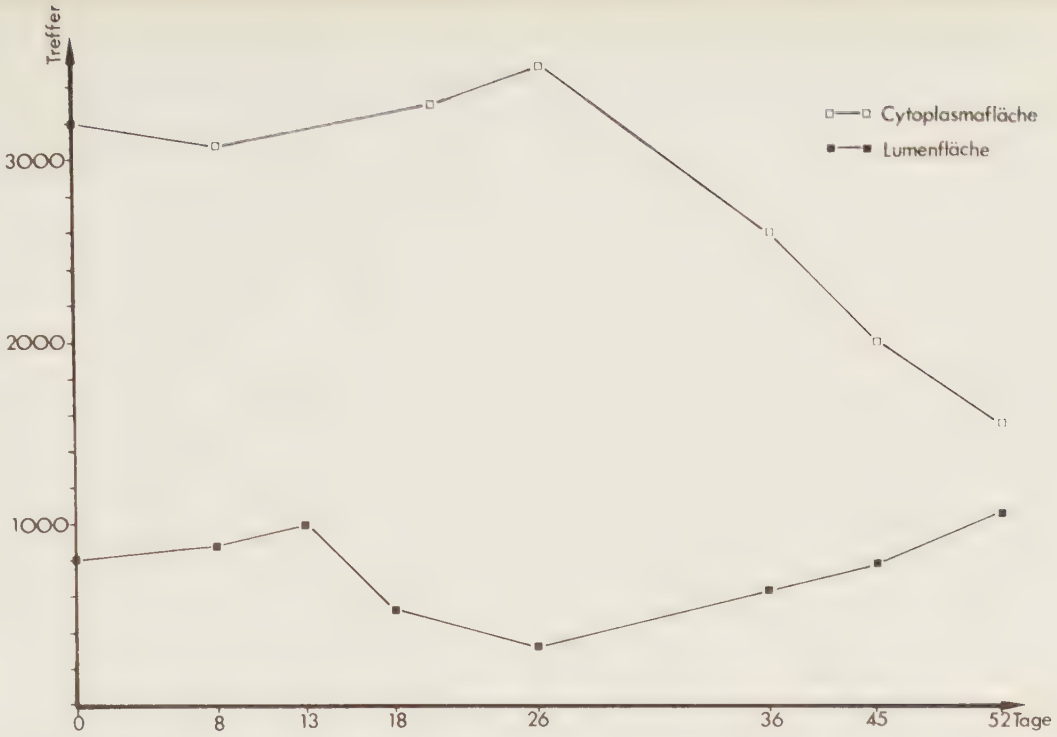


Figur 5



In Figur 3, Figur 4 und Figur 5 sind die Mittelwerte der Treffer über den Kernen von Basalzellen, Spermatocyten und Spermatiden für die Kontrollgruppen (0 Tage) und Versuchsgruppen (8 - 52 Tage nach der Bestrahlung) graphisch dargestellt. Die Werte beziehen sich jeweils auf 100 Kanälchenquerschnitte.

Figur 6



In F i g u r 6 sind die Mittelwerte der Treffer über der "Cytoplasma-" und "Lumenfläche" in 100 Kanälchenquerschnitten für die Kontrollgruppen (0 Tage) und die Versuchsgruppen (8 - 52 Tage nach der Bestrahlung) graphisch dargestellt.

Lebenslauf

Ich, Bernd Dulisch, wurde als Sohn des Lehrers Erich Dulisch und seiner Ehefrau Irmgard Dulisch, geb. Zacheja, am 14. August 1954 in Lünen geboren.

Ich wurde im Jahre 1961 eingeschult und besuchte bis 1965 eine katholische Volksschule in Rheydt. Im Jahre 1965 wechselte ich auf das Städtische Gymnasium (Neusprachliches Gymnasium mit altsprachlichem Zweig) Rheydt-Odenkirchen über. Ich besuchte den altsprachlichen Zweig mit Latein, Englisch und Griechisch als Fremdsprachen. Im Mai 1973 legte ich an dieser Schule die Reifeprüfung ab. Im August und September 1973 leistete ich einen Krankenpflegedienst auf der urologischen Station des Elisabeth-Krankenhauses in Rheydt. Zum Wintersemester 1973/74 immatrikulierte ich mich an der Universität Düsseldorf zum Medizinstudium. Im August 1975 absolvierte ich die Ärztliche Vorprüfung. Als Famulus war ich von Februar bis April 1976 in der chirurgischen Abteilung des Krankenhauses in Mönchengladbach-Rheindalen tätig. Im August 1976 legte ich den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab. Im Frühjahr 1977 famulierte ich abermals einen Monat in der chirurgischen Abteilung des Krankenhauses Mönchengladbach-Rheindahlen.

Mönchengladbach, den 22. Mai 1977

Bernd. Dulisch

Für die Überlassung des Themas und die wertvollen Anregungen bei der Durchführung der Auswertung und der Zusammenstellung der Ergebnisse gebührt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. med. W. H i l s c h e r .

Herrn Prof. Dr. med. H.-W. Schlipköter danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Ich danke dem Tierarzt Herrn G. Gauss für die Bestrahlung und Präparation der Versuchstiere.

Für die Überlassung der Versuchstiere und für die Bereitstellung der Bestrahlungseinrichtungen gilt mein Dank der Geschäftsleitung der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung in Neuherberg bei München sowie dem Direktor der Instituts für Biologie dieser Gesellschaft, Herrn Prof. Dr. O. Hug, und Frau Dr. I. Zeller.

Ich bedanke mich bei Frau Dipl.-Math. U. Krämer für die Hilfe bei den statistischen Auswertungen und bei Frau B. Hilscher für die Auswahl der histometrischen Methodik.